

学 位 論 文 題 名

魚類の精子および胚細胞の凍結保存に関する研究

学位論文内容の要旨

魚類遺伝資源を保存する方法として、精子あるいは受精卵、胚の凍結保存がある。精子の凍結保存は、サケ科魚類を含む比較的多くの有用魚種で研究されているが、絶滅危惧種に関しては、ほとんど研究例がない。一方、受精卵と胚については、液体窒素中での長期にわたる保存例はなく、胚細胞の凍結保存に関して僅かな研究例があるに過ぎない。本研究では、絶滅が危惧されているイトウを材料に、精子の凍結保存方法を開発した。また、水産上重要なサケ科およびコイ目魚類として、サケ、ニジマス、キンギョ、ドジョウについて、胚細胞の凍結保存方法を開発するとともに、凍結胚細胞からの個体再生の可能性についても検討した。

第 1 章では、ペレット法によるイトウ精子の適切な凍結条件を設定するために、受精率を指標に、保存液での希釈比、ペレット 1 粒の容量ならびに耐凍剤の種類に関して検討した。その結果、ジメチルスルフォオキシド（DMSO）を 300mM グルコース溶液（GS）により 10%に調整した保存液で、精液を 1:3 と 1:9 の比で希釈し凍結した精子は高い受精率を示した。50~400 μ l のペレットを解凍し媒精した場合、各群の受精率において有意差は認められなかった。凍結精子で媒精した卵の受精率は、耐凍剤がメタノールの場合に最も高かった。従って、精液を保存液で 1:3 に希釈し、100 μ l のペレットとして凍結すること、耐凍剤としてメタノールを用いることが、イトウ精子の凍結保存において適当であった。

第 2 章では、イトウ精子に適切な凍結用保存液を開発するため、解凍後の運動精子比を指標に、耐凍剤と希釈液の適切な組合せと耐凍剤の最適濃度を検討した。その結果、グリセリンと DMSO は牛胎児血清（FBS）で、メタノールは GS で希釈した保存液が、他の希釈液と組合せたものよりそれぞれ高い運動精子比を示すことが判った。上記 3 種の耐凍剤に適した希釈液との組み合わせでは、いずれも 10%の濃度の耐凍剤で最も高い運動精子比を示した。従って、イトウ精子の

凍結用保存液として 10%グリセリンと FBS、10%DMSO と FBS、ならびに 10%メタノールと GS の耐凍剤と希釈液の組み合わせが適切な保存液であると考えられた。

第 3 章では、サケとニジマス胚細胞をストロー法で凍結保存するための方法を開発した。また、胚の発生段階と胚細胞の凍結耐性の関係について明らかにするとともに、キンギョとドジョウへの応用も試みた。その結果、培養後 2 日目では、10%FBS を含むイーグルの最少必須培地 (MEM_{10}) で培養した胚細胞が、最も高い生存率を示した。胚細胞を 5~20%の各耐凍剤で処理し凍結した場合、10%DMSO を含む MEM_{10} ($\text{DMSO}/\text{MEM}_{10}$) で処理した群が最も高い生存率を示したが、FBS を含まない DMSO/MEM では、これより低い生存率を示した。凍結に際し、 -5°C から -10°C で植氷した胚細胞が高い生存率を示した。胞胚期とこの胚期のニジマス胚細胞は同等の生存率を示したが、サケ胚細胞では桑実胚期より胞胚期において高い生存率を示した。従って、ストロー法によるサケ科魚類胚細胞の凍結保存における適切な条件として、1) 材料として胞胚期の胚細胞が、2) 凍結前処理の胚細胞の培養液として 10%FBS を含む MEM が、3) 透過型耐凍剤として 10%DMSO が、4) DMSO の細胞毒性から胚細胞を保護するための添加物として 10%FBS が、そして、5) -5°C から -10°C の間で植氷操作を行うことが推奨された。上記の方法で凍結し、2 ヶ月以上液体窒素中で保存したキンギョとドジョウ胚細胞は、短時間保存したサケ胚細胞と同等の生存率を示したことから、サケ科魚類胚細胞で開発した凍結保存方法は、他魚種でも応用可能であることが示された。

第 4 章では、サケ胚細胞を用いて簡便で実用的な凍結保存方法であるバイアル法を開発した。また、異なる温度での長期保存の可能性を検討した。その結果、10%DMSO/ MEM_{10} において、バイアル法とストロー法はほぼ同等の生存率を示した。また、 -80°C ディープフリーザーでバイアルを -40°C まで冷却し、液体窒素に浸漬した群 (-40°C までの冷却速度; $1.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$) は、 -60°C まで冷却し液体窒素に浸漬する前後に解凍した群と同等の生存率を示した。一方、 -150°C フリーザーで凍結した胚細胞 (同; $3.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$) では、低い生存率を示した。従って、バイアル法を用いストロー法と同等の生存率を得るために必要な条件として、1) 凍結溶液としては、10%DMSO と 10%FBS を含む MEM を用いること、そして、2) 胚細胞を含む凍結溶液 1ml を収容したバイアルを -80°C フリーザーに配置し、 -40°C (約 40 分間) まで毎分約 1.6°C の割合で冷却することが望ましい

と考えられた。液体窒素と -150°C フリーザーで5年間保存したストローとバイアル内のサケ胚細胞の生存率は、3分間液体窒素に浸漬した胚細胞の結果と類似したことから、保存温度が液体窒素保存用タンクと同程度であれば、胚細胞の生残に影響を与えないことが判明した。従って、凍結保存における保存容器の形状および保存期間にかかわらず、サケ胚細胞の長期保存が可能であることが示唆された。

第5章では、キンギョとドジョウを用い、凍結胚細胞からの個体再生に向けて、凍結胚細胞をレシピエント胚の胚盤下部に移植し生存性のキメラの作出を試みた。また、キメラの生残率を向上させる要因と凍結胚細胞の分化能についても調べた。その結果、キンギョ凍結胚細胞を移植した受精後4日目のギンブナ胚は、未凍結のギンブナ胚細胞を移植した対照群より低い生残率を示した。ドジョウ間の移植実験では、細胞懸濁液中のDMSOと死細胞を除去した後、凍結胚細胞を移植した7日目胚の生残率は、死細胞とDMSOを含む細胞懸濁液中の凍結胚細胞を移植した胚のそれより向上する傾向が示された。従って、細胞懸濁液中に含まれるDMSOと死細胞は、レシピエント胚の発生に有害な影響を与えると推察され、これらを除去することによって、移植胚の生残率が改善されることが考えられる。移植した凍結胚細胞は、各胚葉から分化した様々な器官と組織を構成する細胞および始原生殖細胞として観察されたことから、液体窒素中で長期間保存しても胚細胞は分化多能性を保持していること、および凍結胚細胞を移植した胚がキメラ魚として正常発生すること、さらには、これらのキメラから生殖系列キメラが誕生する可能性が示された。

第6章では、第1章から第5章で得られた知見をもとに、魚類遺伝資源の保存における将来展望について総合的論議を行った。凍結精子と人為雄性発生、あるいは凍結胚細胞と生殖系列キメラの組合せによる保存細胞からの個体再生における効率は不明であるが、施設と機器に限定して考えると、後者がより現実的であろう。今後、魚類精子あるいは胚細胞の凍結保存技術と保存細胞からの個体再生技術の組合せは、希少種の保存と復活において有効な手段として利用されるであろう。また、養殖業と栽培漁業においても、これらの技術は品種や地方集団の系統維持、育種素材の確保、選抜家系の危険分散において有効な手段であり、魚類の育種をさらに発展させるものになると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 阿 部 周 一
副 査 教 授 山 羽 悦 郎

学 位 論 文 題 名

魚類の精子および胚細胞の凍結保存に関する研究

近年の人間活動の発展に伴い、魚類においても野生集団の急激な減少が危惧されている。野生集団の有する遺伝資源は、栽培漁業や養殖における素材として人類が利用できる財産であり、これらの保全に必要な措置を講ずることと、利用できる形で保存しておくことは急務である。魚類遺伝資源保存の技術としては、精子の凍結保存法が多くの有用魚種で研究されてきたものの、絶滅危惧種に関する取り組みはほとんど例がない。また、受精卵と胚の長期冷凍保存について成功例はなく、これらの凍結保存に関しては解決すべき課題が多くある。本学位論文では、魚類遺伝資源を長期にわたり確実に保存する方法として、精子および初期胚細胞の凍結保存に着目し、その諸条件を検討することにより、実用的な技術を開発するとともに、胚操作によるキメラ個体作出による凍結胚細胞からの個体再生の可能性についても検討し、以下の評価すべき成果を得た。

- 1) 絶滅が危惧されているイトウを材料として、ペレット法による精子の適切な凍結方法を開発した。すなわち、受精率を指標にして、保存液での希釈比、ペレット一粒の容積並びに耐凍剤の種類を詳細に検討した結果、メタノールを耐凍剤として用いた保存液で精液を 1:3 に希釈し、100 μ l のペレットとして凍結することが適切であることが明らかとなった。
- 2) イトウ精液をペレット法で保存する際の適切な凍結用保存液を開発するため、解凍後の運動精子比を指標に、耐凍剤と希釈液の適切な組み合わせと、耐凍剤の最適濃度を検討した。その結果、凍結用保存液として 10%グリセリンと牛胎児血清 (FBS)、10%DMSO と FBS、ならびに 10%メタノールと 300mM グルコース溶液の、3 種類の耐凍剤と希釈液

の組み合わせが適切な保存液であることが明らかとなった。

3) サケとニジマスの胚細胞を、ストロー法で凍結保存するため、その凍結条件の検討を行なった。その結果、材料として胞胚期の胚細胞が、凍結前処理の胚細胞の培養液として 10%FBS を含む MEM が、透過型凍結剤として 10%DMSO が、DMSO の細胞毒性から胚細胞を保護するための添加物として 10%FBS が、そして、 -5°C から -10°C の間で植氷操作を行なうことが推奨された。

4) 上記の条件でキンギョとドジョウの胚細胞を凍結したところ、2 ヶ月以上液体窒素中で保存した胚細胞も、短時間保存したサケ胚細胞と同等の生残率を示した。このことから、サケ科魚類胚細胞で開発した凍結保存方法は、他魚種でも応用可能であることが明らかとなった。

5) ストロー法よりも簡便で実用的であるバイアル法で、サケ胚細胞を凍結する条件の検討を行なった。その結果、凍結溶液として、10%DMSO と 10%FBS を含む MEM を用いること、そして胚細胞を含む凍結溶液 1ml を収容したバイアルを -80°C フリーザーに配置し、 -40°C (約 40 分間) まで毎分約 1.6°C の割合で冷却した後に、 -150°C フリーザーあるいは液体窒素中で保存することが望ましいことが明らかになった。さらに、液体窒素と -150°C フリーザーで 5 年間保存したバイアルとストロー内のサケ胚細胞の生存率が、短時間(3 分間)液体窒素に浸漬した場合と同程度であったことから、保存温度が液体窒素保存用タンク内と同様であれば、保存容器の形状にかかわらず長期の保存が可能なが明らかになった。

6) 凍結保存した胚細胞の分化多能性を、宿主胚へ移植することにより検討した。すなわち、材料にキンギョおよびドジョウを用い、凍結胚細胞をレシピエント胚の胚盤下部に移植してキメラ作出を行った。その結果、キメラ胚の生存率は、細胞懸濁液中の DMSO と死細胞を除去することにより向上する傾向が示された。さらに、組織学的な観察から、移植した凍結胚細胞由来の細胞が分化した様々な器官に認められたこと、また、始原生殖細胞として確認されたことから、解凍後の胚細胞は宿主胚の中で、外中内胚葉系列および生殖系列の細胞に分化していることが明らかにされ、これらのキメラ胚から生殖系列キメラが誕生する可能性が示された。

申請者による以上の成果は、魚類の遺伝資源の保存および保存細胞からの個体再生の

技術の確立に大きく寄与するものであり、さらには今後の魚類の発生工学技術の発展に資するものとして、審査員一同は本研究が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。